

①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

①2 Offenlegungsschrift  
①1 DE 34 10631 A1

⑤1 Int. Cl. 3:  
**A61 K 35/12**  
A 61 K 37/64  
A 61 L 15/00

②1 Aktenzeichen: P 34 10 631.6  
②2 Anmeldetag: 22. 3. 84  
④3 Offenlegungstag: 27. 9. 84

DE 3410631 A1

③0 Unionspriorität: ③2 ③3 ③1  
23.03.83 IL 68218

⑦1 Anmelder:  
Ramot University Authority for Applied Research  
and Industrial Development Ltd., Tel Aviv, IL

⑦4 Vertreter:  
Vossius, V., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Vossius, D.,  
Dipl.-Chem.; Tauchner, P., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.;  
Heunemann, D., Dipl.-Phys. Dr.rer.nat.; Rauh, P.,  
Dipl.-Chem. Dr.rer.nat., Pat.-Anw., 8000 München

⑦2 Erfinder:  
Itay, Samuel, Dr., Kfar Saba, IL; Nevo, Zvi, Dr.,  
Herzlia, IL

Behördeneigentum

⑤4 Implantationsmaterial zur Wiederherstellung defekter Knorpel und Knochen

Beschrieben ist Implantationsmaterial zur Wiederherstellung von Knorpel- und Knochendefekten. Das Implantationsmaterial liegt entweder in Gelform vor oder eingebettet in natürliches oder künstliches Knochenmaterial. Das Gel enthält bestimmte Arten von Zellen. Diese Zellen können embryonale Chondrocyten oder Mesenchymzellen sein, die sich im allgemeinen unter dem Einfluß von chondrogenen Induktionsfaktoren in Knorpelzellen überführen lassen. Ferner enthält das Gel Fibrinogen, eine Antiprotease und Thrombin. Die Zellen sollen artspezifisch sein. Vorzugsweise werden dem Gel auch eine extrazelluläre Matrix (ECM) von Chondrocyten, andere Wachstumshormone und/oder Wachstumsfaktoren, wie SM (Somatomedin = IGF-I), FGF (Fibroblastenwachstumsfaktor), CGF (Knorpelwachstumsfaktor), BDGF (Knochenwachstumsfaktor) oder eine Kombination dieser Substanzen zugegeben.

DE 3410631 A1

5 u.Z.: S 887 (Vo/kä)  
Case: 50 158

Ramot University Authority for Applied Research  
and Industrial Development Ltd.  
10 Tel-Aviv, Israel

" Implantationsmaterial zur Wiederherstellung defekter  
Knorpel und Knochen "

15

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Implantationsmaterial zur Wiederherstellung von Gelenk-  
20 knorpel- und Knochendefekten, gekennzeichnet  
durch einen Gehalt artspezifischer embryonaler  
Chondrocyten oder von Mesenchymzellen, die durch  
Induktionsfaktoren in Knorpelzellen überführbar sind,  
zusammen mit einem biologischen Leim aus Fibrinogen,  
25 Thrombin sowie einem natürlichen oder chemischen  
Proteaseinhibitor.
2. Implantationsmaterial nach Anspruch 1, gekennzeichnet  
durch einen Gehalt von 100 000 bis 500 000 Chondrocyten  
30 oder Mesenchymzellen pro ml.
3. Implantationsmaterial nach Anspruch 1, gekennzeichnet  
durch einen Gehalt von 5 bis 20 mg/ml einer extrazellu-  
lären Matrix (ECM).

35

L

J

- 1 4. Implantationsmaterial nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch einen Gehalt an einem lokalen Wachstumsfaktor oder einem hormonellen Wachstumsfaktor.
- 5 5. Implantationsmaterial nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß der lokale Wachstumsfaktor aus Knorpel (CDF) oder Knochen (BDGF) stammt.
- 10 6. Implantationsmaterial nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß der hormonelle Wachstumsfaktor Somatomedin aus Serum oder der Hypophyse stammt.
- 15 7. Implantationsmaterial nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen Chondrocyten oder Zellen sind, die sich von Bindegewebe mit undifferenzierten Mesenchymzellen ableiten, die in Kulturen proliferieren und in Chondrocyten überführbar sind.
- 20 8. Implantationsmaterial nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Material in geformten, gefriergetrockneten (Kiel) oder künstlichen Knochen eingebettet ist.
- 25 9. Verwendung des Implantationsmaterials nach Anspruch 1 bis 8 zur Wiederherstellung von Epiphysenknorpel und Knochen.
- 30 10. Implantationsmaterial zur Wiederherstellung von Gelenknorpel- und Knochendefekten, gekennzeichnet durch einen Gehalt an geeignet geformtem Knochenmaterial, das mit einem Gel aus Thrombin, einer Antiprotease und Fibrinogen imprägniert ist, zusammen mit einer extrazellulären Matrix (ECM) oder mit einem lokalen oder  
35 hormonellen Wachstumsfaktor und gegebenenfalls einer geringen Menge artspezifischer embryonaler Chondrocyten oder Mesenchymzellen, die durch Induktionsfaktoren in Knorpelzellen überführbar sind.

1

5 Die Erfindung betrifft Implantationsmaterial zur Wiederher-  
stellung von Gelenkknorpel- und Knochendefekten. Das Implantations-  
material kann entweder in Form eines Gels vorliegen oder  
zusammen mit natürlichen oder künstlichen Knochen als Trä-  
germaterial. Das Implantationsmaterial der Erfindung eignet  
10 sich vor allem zur Wiederherstellung defekter Gelenkknor-  
pel, da diese besonders schwierige biologische Strukturen  
darstellen. Das Implantationsmaterial der Erfindung ent-  
hält eine Kombination embryonaler Chondrocyten oder be-  
stimmter Mesenchymzellen, die in Knorpelzellen unter dem  
15 Einfluß von chondrogenen Induktionsfaktoren überführbar  
sind, sowie geeignete Mengen Fibrinogen, Thrombin und eines  
Proteaseinhibitors (Antiprotease) als biologischen Leim.  
Die erhaltenen Gele lassen sich längere Zeit lagern, wenn  
sie in gleicher Weise gelagert werden wie Gewebekulturen.  
20 Sie lassen sich transportieren und leicht handhaben.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform kann den Gelen eine  
extrazelluläre Matrix (ECM) oder bestimmte Wachstumsfakto-  
ren, wie SM, FGG, CGF, BDGF oder eine Kombination dieser  
25 Wachstumsfaktoren zugegeben werden. Zur Wiederherstel-  
lung von Knochendefekten können sie als Implantationsmaterial ein-  
gesetzt werden, das geeignet geformte Knochenteile einge-  
bettet in diesen Gelen enthält.

30 Bei der Beschädigung von Gelenkknorpeln durch Verletzungen,  
Infektionen oder degenerative Prozesse erfolgt im allgemei-  
nen keine Heilung oder Besserung. Es wurden bereits Versu-  
che unternommen, osteochondrale Verpflanzungen durchzu-  
führen und verschiedene Prothesen zu entwickeln, doch wa-  
ren die Ergebnisse schlecht und entmutigend. Es sind auch  
35 Versuche zur Verwendung gezüchteter Chondrocyten als Quel-

1 le für Knorpeltransplantate bekannt geworden, doch war die  
Integration der Transplantate in die benachbarten Knorpel im  
allgemeinen unbefriedigend.

5 Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, Implantationsma-  
terial zur Wiederherstellung von Gelenkknorpel- und Knochen-  
defekten zur Verfügung zu stellen, das bestimmte Zellen, näm-  
lich embryonale Chondrocyten oder aus Mesenchym stammende  
Zellen enthält, die sich in vitro oder in vivo in Knorpel-  
10 zellen unter dem Einfluß von chondrogenen Induktionsfaktoren  
überführen lassen. Dieses Implantationsmaterial liegt in einem  
geeigneten biologischen Milieu und als Gel vor. Eine weitere  
Aufgabe der Erfindung ist es, ein Verfahren zur Herstellung  
des Implantationsmaterial zu entwickeln.

15

Das Implantationsmaterial wird folgendermaßen hergestellt:  
Embryonale Chondrocyten (junge Chondrocyten) werden aus  
Embryonalgewebe durch Trypsinbehandlung und mechanische Zer-  
legung gewonnen und in einem geeigneten Medium gezüchtet. Die  
20 Zellen werden danach geerntet und mit Fibrinogen, einem Protease-  
inhibitor (Antiprotease) und Thrombin vermischt. Es wird ein  
Gel erhalten, das in einem Inkubator eine gewisse Zeit aufbe-  
wahrt werden kann. Die geernteten Zellen können auch längere  
Zeit tiefgefroren aufbewahrt werden. Unmittelbar vor der Ver-  
25 wendung wird das Material aufgetaut. Das Gel wird vor der  
Implantation in eine Lösung von Fibrinogen getaucht. Nun wird  
der Defekt mit einer Thrombinlösung besprüht und dann mit dem  
Implantationsmaterial aufgefüllt. Durch Versuche an Vögeln  
und Säugern wurde nachgewiesen, daß Gelenkknorpel- und Kno-  
30 chendefekte sich gut auffüllen. Dies zeigte eine Untersu-  
chung nach 2 bis 12 Monaten nach der Implantation.

35

1 Das Implantationsmaterial der Erfindung eignet sich zur Wiederherstellung defekter humaner Gelenkknorpel oder Knochen. Die Ursache des Defektes kann Trauma oder Altersverschleiß sein. Das Verfahren kann zur Wiederherstellung der verschiedensten Knorpel- und Knochendefekte in Frage kommen, einschließlich degenerativer Veränderungen und Brüche im Gelenkbereich.

10 Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform enthält das Implantationsmaterial eine bestimmte Menge einer extrazellulären Matrix (ECM) von embryonalen Chondrocyten, die auf eine bestimmte, nachstehend geschilderte Weise gewonnen werden. Die extrazelluläre Matrix fördert das Wachstum der Chondrocyten nach Implantation des Materials.

15 Die Chondrocyten werden aus artspezifischem embryonalem Epiphysengewebe erhalten, mit anderen Worten, das embryonale Epiphysengewebe wird der gleichen Art entnommen, der später das Material der Erfindung implantiert werden soll. 20 Allogene Zellen ergeben befriedigende Ergebnisse, ohne daß man auf HLA-Typisierung angewiesen ist. Für die Humanmedizin werden humane embryonale Chondrocyten gezüchtet.

Es wurde festgestellt, daß die Zahl der Chondrocyten pro 25 Volumeneinheit einen bestimmten Wert nicht übersteigen soll, da sonst Zellnekrosen erfolgen und schlechtere Ergebnisse erhalten werden. Typische Werte für Chondrocytenkonzentrationen sind etwa 100 000 bis 500 000 pro ml des Gels. Es werden etwa 5 bis 50 Einheiten Thrombin pro ml und etwa 25 bis 30 80 mg/ml Fibrinogen verwendet. Im allgemeinen wird der Proteaseinhibitor dem Implantationsmaterial zugesetzt, um eine rasche Lysis des Gels zu verhindern oder zu unterdrücken. Es können natürliche oder synthetische Proteaseinhibitoren verwendet werden. Beispiele für geeignete chemische Proteaseinhibitoren sind  $\epsilon$ -Aminocapronsäure, die in 35 einer Menge von 10 bis 20 mg/ml Gel verwendet wird, und Tranexemsäure, die in einer Menge von 1 bis 2 mg/ml Gel ver-

- 1 wendet wird. Es können auch natürliche Proteaseinhibitoren  
verwendet werden, wie Antitrypsin (Hühnereiweiß, Sigma,  
Typ III) in einer Konzentration von 50 bis 75 µg/ml. Sofern  
5 10 Einheiten/ml Thrombin verwendet. Wenn das Gel rasch fest  
werden soll, werden etwa 20 bis 50 Einheiten/ml Thrombin  
verwendet.

- Außerdem ist es vorteilhaft, dem Gel einen oder mehrere Wachs-  
10 tumsfaktoren des lokalen Typs, wie ECM oder BDGF, oder des  
hormonellen Typs, wie Somatomedin (SM)-ähnliche Peptide,  
Knorpelwachstumsfaktor (CGF) und dergl. zuzufügen. Die  
Wachstumsfaktoren werden in folgenden Mengen verwendet:  
ECM einige mg/ml, BDGF etwa 100 µg/ml, CGF einige Nanogramm/ml,  
15 SM einige Nanogramm/ml.

- Medium
- Das Implantationsmaterial kann überschichtet mit F-12/sowie  
10 % fetalem Kälberserum einige Wochen in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator  
bei 37°C aufbewahrt werden. Das gelartige Implantationsma-  
20 terial ist sofort verwendbar und kann unmittelbar auf den  
wiederherzustellenden Bereich aufgebracht werden.

- Für bestimmte Wiederherstellungsmaßnahmen, ist es zweckmäßig,  
Implantationsmaterial zu verwenden, das aus einer Knochen-  
25 struktur (natürlich oder künstlich) <sup>besteht</sup> /eingebettet in ein Gel  
der Erfindung, d.h. ein Gemisch aus Thrombin, Antiprotease,  
Fibrinogen und einem oder mehreren Wachstumsfaktoren und/  
oder-hormonen sowie einer geringen Konzentration der vorge-  
nannten Arten von Zellen oder sogar ohne diese Zellen. Im  
30 letztgenannten Fall dringen Zellen aus der Umgebung lang-  
sam in das Implantat ein und bilden eine zusammenhängende  
Masse zwischen Umgebung und Implantat.

Die Beispiele erläutern bevorzugte Ausführungsformen.

## B e i s p i e l 1

Herstellung eines Implantationsmaterial zur Wiederherstellung von Knorpeldefekten

Als Ausgangsmaterial werden die Epiphysen von langen Knochen (Tibia, Femur) verwendet.

Zur Isolierung embryonaler Chondrocyten (junger Chondrocyten) werden die Epiphysen einer energischen Trypsinbehandlung unterworfen, d.h. 45 Minuten auf einer Drehschüttelmaschine in einem Wasserbad mit einer Trypsinkonzentration von 1 % behandelt und gleichzeitig mit einem Homogenisator mechanisch aufgebrochen. Dann wird das Trypsin durch Zugabe von Serum inaktiviert, das antiproteolytische Substanzen enthält. Die erhaltene Suspension von Einzelzellen wird sodann mehrere Tage (6 bis 10 Tage) in einem flüssigen Ham F-12 Medium auf Platten überimpft, die mit Weichagar (0,6 % Agar, enthaltend Ham F-12 Medium) beschichtet sind. Während dieser Wachstumsperiode sterben die meisten Fibroblasten ab und es erfolgt eine Anreicherung an Chondrocyten. Die Zellen von den Weichagarplatten werden sodann in Spinner-Flaschen überführt und in F-12 Medium in Suspension weitere 3 bis 10 Tage gezüchtet. Die Wachstumsbedingungen in Spinner-Flaschen fördern die bevorzugte Bildung von Chondrocyten gegenüber Fibroblasten. Sodann werden die Zellen aus den Spinner-Flaschen abgeschleudert und unmittelbar verwendet oder in 20prozentigem fetalem Kälberserum mit 10 % Dimethylsulfoxid und 70 % F-12 Medium bei der Temperatur des flüssigen Stickstoffs eingefroren. Das beim Zentrifugieren der Chondrocyten erhaltene Sediment wird in einem geringen Volumen Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung mit 50 mg/ml Fibrinogen oder einem anderen serumpräzipitierenden Protein und einem Trypsininhibitor (50 µg/ml, Sigma Typ III) oder einer anderen Antiprotease suspendiert.



1 Die jüngste Lösung, die Zellen (je nach Alter in der Kultur  
und der Größe in einer Konzentration von 1 bis  $5 \times 10^5$ /ml)  
sowie Fibrinogen und Trypsininhibitor enthält, wird als  
Lösung A bezeichnet. Eine Mikrotestplatte (96 F Nunc Dänemark  
5 mit Ausguß) oder eine Zelle mit vielen Näpfchen wird mit  
30 µl Thrombinlösung (Lösung B) (1U/30 ml 40 mM  $\text{CaCl}_2$ ) in je-  
des Näpfchen versetzt und gleichmäßig am Boden und an der  
Seitenwand verteilt. Sodann werden 90 µl der Lösung A zugege-  
ben. Hierauf läßt man das Gemisch gelieren.

10

Erforderlichenfalls kann die Endmenge geändert werden, wobei  
das Volumenverhältnis von Lösung A zu Lösung B auf einen Wert  
von 3 : 1 eingestellt wird. Das mit 0,2 ml F-12 Medium über-  
schichtete Gel läßt sich etwa 14 Tage in einem Inkubator mit  
15 5 bis 10 %  $\text{CO}_2$  enthaltender Luft oder in tiefgefrore-  
nem Zustand aufbewahren.

Vor der Transplantation wird der defekte Bereich vorsichtig mit  
einer Thrombinlösung besprüht. Das Gel wird vor der Transplan-  
20 tation in eine Lösung getaucht, die Fibrinogen und Trypsin-  
inhibitor (50 mg/ml bzw. 50 µg/ml) enthält. Sodann wird das  
Material in den defekten Bereich eingedrückt und dieser Be-  
reich aufgefüllt.

25 Anstelle von embryonalen Chondrocyten können auch embryonale  
Mesenchymzellen (Stufe 24) oder Knochenmark-Stammzellen ver-  
wendet werden. Außerdem kann jedes erwachsene Bindegewebe  
mit darin enthaltenen undifferenzierten Mesenchymzellen verwen-  
det werden, die in Kultur Zellen bilden und schließlich  
30 durch Selbstdifferenzierung oder gesteuert durch chondrogene  
Faktoren in Chondrocyten überführt werden.

Für genetisch identische (syngene) Transplantate können homogeneische  
Mesenchymzellen verwendet werden, die in erwachsenem Gewebe  
35 des Empfängers enthalten sind, z.B. Hautfibroblasten,  
Knochenmarkzellen, die durch Biopsie erhalten werden, und die

- 1 Zellen in Kultur bilden, die in Chondrocyten überführbar sind.

## B e i s p i e l 2

5

### Herstellung eines Gels, das ECM (extrazelluläre Matrix) enthält

#### a) Herstellung von ECM

- 10 Embryonale Hühnerchondrocyten, die 14 bis 21 Tage in Spinner-Flaschen kultiviert worden sind, werden in mit Fibronectin beschichtete Petrischalen in einer Anfangsdichte von  $2 \times 10^5$  Zellen/35 mm Petrischale in ein F-12 Medium überimpft, das 50 µg/ml Ascorbinsäure enthält. Die Zellkulturen
- 15 fließen innerhalb 6 Tagen zusammen. Sodann wird das Medium erneuert, und die Kulturen werden weitere 6 Tage inkubiert. Drei Kontrollkulturen werden mit Trypsin behandelt und danach werden die Zellen mit einem Coulter Zähler Modell D gezählt. Die Zelldichte beträgt etwa  $1 \times 10^6$  Zellen pro Petrischale. Sämtliche anderen Petrischalen werden sodann mit
- 20 Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS) gewaschen, 20 Minuten mit 20 mM wäßriger Ammoniaklösung behandelt und erneut dreimal mit PBS und sodann zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen, so daß keine Cytoskelette oder Kerne zusammen mit dem intakten ECM beobachtet werden können. Das
- 25 ECM wird mit einem Gummischaber gesammelt und gefriergetrocknet. Die Ausbeute an getrocknetem ECM-Pulver beträgt etwa 0,3 bis 1,0 mg pro Petrischale.
- 30 Das ECM wird in einer Menge von 5 bis 20 mg/ml, insbesondere 10 mg/ml verwendet.

- Versuche mit Chondrocytengelen bei Vögeln und Säugern haben nach makroskopischer Untersuchung, im histologischen Schnitt
- 35 und durch biochemische Tests ergeben, daß die Transplantationsstelle innerhalb 2 bis 3 Monaten gut ausgefüllt und in die Umgebung

- 1 einschließlich der Oberflächen der Gelenkknorpel eingefügt  
ist. Im Transplantat: zeigen sich aktive proliferierende Knor-  
pelzellen, die den typischen Stoffwechsel zeigen, und die  
gut verbunden sind (ohne Faserknorpel oder anderes weiches  
5 Gewebematerial an den Kanten) mit dem ursprünglichen Knorpel-  
gewebe.

10

15

20

25

30

35

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**